DIE BINDUNG VON PHARMAKA AN HUMANHÄMOGLOBIN

Christoph Hilzenbecher

1972

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Kiese

Die Bindung von Pharmaka an Humanhämoglobin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christoph Hilzenbecher
aus
Herrsching

1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 16.5.1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

I. EINLEITUNG

Unspezifische Wechselwirkungen zwischen niedermolekularen körpereigenen und körperfremden Substanzen einerseits und Plasmaproteinen sowie intrazellulär fixierten Proteinen andererseits spielen eine wichtige Rolle bei der Speicherung und Verteilung dieser Substanzen im lebenden Organismus. Sie beeinflussen mittelbar ihre spezifische Wirkung, ihre Biotransformation und ihre Exkretion (BRODIE u. HOGBEN, 1957; GOLDSTEIN, 1949; ALY et al., 1968; WITZGALL u. BOYENS, 1964; SCHELER, 1969; KRIEGLSTEIN, 1969).

Seit BENNHOLDs (1938) umfassenden Arbeiten über die Vehikelfunktion der Bluteiweißkörper hat die Literatur über die Plasmaproteinbindung körpereigener und körperfremder Substanzen beträchtlich an Umfang zugenommen. Obgleich BENNHOLD auf die Rolle des Erythrozyten als Vehikel hinweist und ihn als "schwimmenden Ort erhöhter Konzentration oder als schwimmenden Mangelort" bezeichnet, sind Mitteilungen über die Bindung an Hämoglobin äußerst spärlich und unsystematisch. WITZGALL u. BOYENS (1964) nehmen für besonders stark an Erythrozyten gebundene Sulfonamide eine Adsorption an intrazelluläres Hämoglobin an. SCHANKER et al. (1961, 1964) bestimmten die Bindung von p-Nitroanilin (72 %), Serotonin (42 %), Phenolrot (76 %) und Sulfosalicylsäure (45 - 55 %) sowohl an Lösungen kristallisierten Humanhämoglobins als auch an Hämoglobinlösungen, die durch Homogenisierung menschlicher Erythrozyten erhalten wurden. Voraussetzung für die Bindung einer Substanz an intrazelluläres Hämoglobin ist ihre Penetration in den Erythrozyten. Diese hängt in hohem Maße von den lipoiden Eigenschaften der Substanz ab (KURZ, 1970a). Auch zwischen der Eiweißbindung einer Substanz und ihrer Lipoidlöslichkeit besteht ein Zusammenhang (Zitate bei KRIEGLSTEIN, 1969).

Auf die Tatsache, daß Rinderhämoglobin organische Substanzen in Abhängigkeit von ihrer Lipophilie bindet, weisen KIEHS et al. (1966) hin. Berücksichtigt man, daß der Hämoglobingehalt menschlichen Blutes mehr als doppelt so groß ist wie der Gehalt an Plasmaproteinen (DOCUMENTA GEIGY, 1960), so wird die pharmakokinetische Bedeutung der Hämoglobinbindung lipophiler Substanzen deutlich.

Nachdem bisher nur wenige Daten über die Bindung von Arzneimitteln an Hämoglobin bekannt sind, war es Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Bindung einer Reihe von Pharmaka an Humanhämoglobin zu untersuchen.

II. METHODIK

A. Herstellung der Hämoglobinlösung

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Hämoglobinlösungen dienten Vollblutkonserven*, welche vor ihrer weiteren Verarbeitung bis zu 20 Tage bei + 4 °C gelagert worden waren. Es wurden jeweils 5 - 10 Konserven gleichzeitig verarbeitet, so daß die Hämoglobinlösungen immer ein Gemisch aus den Blutfarbstoffen mehrerer Spender darstellten.

1. Herstellung eines plasmafreien Erythrozytenkonzentrates

Das Vollblut wurde durch doppelte Lagen Mull koliert und das Plasma durch 30 Min. langes Zentrifugieren bei 2000 x g abgetrennt. Plasma und die oben schwimmende Leukozytenschicht wurden abgesaugt. Danach wurde 1 Teil des Erythrozytensedimentes mit 2 Teilen eines isotonen, 1/8 molaren Phosphatpuffers von pH 7,4 verrührt und anschließend abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch zwei-

---

* Dem Südbayerischen Blutspendedienst der Landeshauptstadt München danken wir für die Überlassung der Konserven.

mal wiederholt. Die nach dem letzten Waschvorgang sedimentierten Erythrozyten wurden in kleinere Zentrifugengläser umgefüllt und nochmals 30 Min. bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Injektionskanüle abgesaugt. Die so von Plasmaproteinen gereinigten Erythrozyten wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -30 °C eingefroren.

2. Herstellung eines Hämolysates aus dem Erythrozytenkonzentrat

Tiefgefrorenes Erythrozytenkonzentrat wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut. Dieser Vorgang führt bereits zu einer partiellen Hämolyse. Die vollständige Hämolyse wurde durch Ultraschall herbeigeführt und deren Vollständigkeit im Ausstrich mikroskopisch kontrolliert. In Portionen von ungefähr 100 ml wurde das Erythrozytenkonzentrat mit einem MSE 100 WATT ULTRASONIC DISINTEGRATOR 20 Min. lang beschallt (Beschallungsfrequenz 22 kHz bei vorgeschriebener Eintauchtiefe des Titanstabes von 1 cm). Vor Beginn der Beschallung war das Erythrozytenkonzentrat auf die Temperatur eines Eis-Wasser-Gemisches herabgekühlt worden. Diese Kühlung wurde auch für die Dauer der Beschallung beibehalten.

3. Herstellung der bei den Bindungsversuchen verwendeten Hämoglobinlösung

Die zur Bestimmung der Bindung von Pharmaka an Hämoglobin verwendete Hb-Lösung besaß eine Konzentration von 25 $\pm$ 1 g Hb/100 ml. Die Konzentration des Ultraschall-Hämolysates war zum Teil wesentlich höher (bis zu 38 g Hb/100 ml), so daß entsprechende Verdünnungen vorgenommen werden mußten. Dazu wurde der erwähnte Phosphatpuffer (pH 7,4, 1/8 molar) verwendet. Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte durch Messung des mit

Dithionit reduzierten Hämoglobins bei 555 m/u (KURZ u. WALLER, 1955). Vor der Bestimmung der Bindung an Hämoglobin wurde der pH-Wert der Hämoglobinlösung kontrolliert und gegebenenfalls mit 0,1 n Natronlauge bzw. 0,1 n Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.

B. Dialyse

1. Verfahren und Hilfsmittel

Zur Bestimmung der Bindung von Substanzen an Humanhämoglobin wurde das Verfahren der Gleichgewichtsdialyse in der Form angewandt, wie es von FRIEMEL (1968) beschrieben wurde. Dieses Verfahren besitzt den Vorteil, daß es ohne großen apparativen Aufwand die Untersuchung einer Vielzahl von Einzelproben ermöglicht.

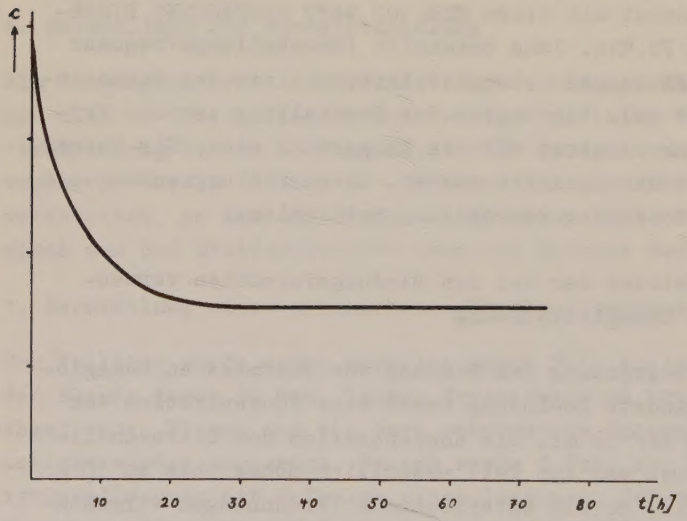


Abb. 1: Einstellung des Gleichgewichtes in der verwendeten Dialysiervorrichtung.
Dargestellt ist die Abnahme der Konzentration (c) in der Außenflüssigkeit in Abhängigkeit von der Zeit (h).
Substanz: SULFADIMETHOXIN, Ausgangskonzentration in der Außenflüssigkeit: 10^{-4} molar.
Konzentration der Hb.-Lösung: 33,0 gHb/100 ml
Temperatur: + 4 °C

Als semipermeable Membran dienten Visking-Dialysierschläuche (Typ 8/32) mit einer Breite (flach) von 10 mm, einer Wandstärke von 0,05 mm und einer mittleren Porenweite von 15 - 20 x 10^{-8} cm*. Die Füllungsvolumina betrugen in jedem Falle 10 ml. Während die mit Phosphatpuffer (1/8 molar, pH 7,4) gefüllten Schäuche ohne Spannung zugeknotet wurden, war es bei den mit der Hämoglobinlösung gefüllten Schläuchen notwendig, darauf zu achten, daß erstens keine Luftblase im Schlauch verblieb und zweitens der Inhalt des Schlauches beim Knoten unter Spannung gesetzt wurde, um einen störenden Wassereinstrom aus der Außenflüssigkeit aufgrund der osmotischen Wasseranziehung der Hämoglobinlösung zu verhindern.

Die Dialyse erfolgte bei + 4 °C im Kühlraum, ihre Dauer betrug mindestens 40 Stdn.. Nach dieser Zeit konnte sicher mit der Einstellung des Dialysegleichgewichtes gerechnet werden (Abb. 1).

2. Zusammenstellung der Ansätze

Eine direkte Bestimmung des an Hämoglobin gebundenen Substanzanteiles ist nicht möglich; seine Berechnung erfolgt mittelbar aus zwei Größen, nämlich dem freien Anteil und der Gesamtkonzentration der Substanz in der Hämoglobinlösung. Zur Ermittlung dieser Größen sind die in Tabelle 1 angegebenen Ansätze erforderlich. Ansatz I, II und III wurden jeweils dreimal gemacht, Ansatz IV bestand aus 11 Proben. Die erhaltenen Extinktionen aus Ansatz I bis III wurden jeweils gemittelt, aus den 11 Werten des IV. Ansatzes wurde für jeden einzelnen unter Verwendung der Mittelwerte I - III der gebundene Anteil berechnet.

---

* Firma SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg

Inhalt d. Dialysierschlauches Volumen:S = 10ml	Außenflüssigkeit Volumen:D = 10ml	Extinktion der Außenflüssigkeit	Bestimmt wird:
I. Puffer	Puffer ohne Substanz	E_o'	Blindwert des Puffers
II. Puffer	Puffer mit Substanz	E_2	Konzentration der Gesamtmenge im Dialysiersystem
III. Hämoglobinlösung	Puffer ohne Substanz	E_o	Blindwert der Hämoglobinlösung
IV. Hämoglobinlösung	Puffer mit Substanz	E_1	Konzentration des freien Anteiles der Substanz in der Hb.-Lsg.

Tab.1: Erforderliche Ansätze
Als Puffer wurde 1/8 molarer Phosphatpuffer pH 7,4 verwendet.

3. Berechnung des gebundene Anteiles ß

Die Berechnung des gebundenen Anteiles ß erfolgte als prozentualer Anteil der gebundenen Substanz an der Gesamtkonzentration in der Hämoglobinlösung.

Die Gesamtmenge der Substanz im Dialysiersystem ohne stattgehabte Bindung (Ansatz II) muß gleich der Gesamtmenge der Substanz im Dialysiersystem nach stattgehabter Bindung (Ansatz IV) sein.

1) $m_{II} = m_{IV}$

m_{II} und m_{IV} setzen sich aus folgenden Teilen zusammen:

2) $m_{II} = m_{IIa} + m_{IIi} + m_{IIs}$

m_{IIa} = Menge im Außenvolumen

m_{IIi} = Menge im Schlauchvolumen

m_{IIs} = Menge, die an den Schlauch adsorbiert ist

3a) $m_{IV} = m_{IVa} + m_{IVi} + m_{IVs}$

m_{IVa} = Menge im Außenvolumen nach Bindung

m_{IVi} = Menge im Schlauchvolumen nach Bindung, die sich aus m_f = freie, im lösenden Wasservolumen gelöste Menge und m_g = an Hämoglobin gebundene Menge zusammensetzt.

m_{IVs} = Menge, die an den Schlauch adsorbiert ist

3b) $m_{IV} = m_{IVa} + m_f + m_g + m_{IVs}$

Aus den Gleichungen 1), 2) und 3b) ergibt sich, da $m_{IIs} = m_{IVs}$, für die gebundene Menge:

4) $m_g = m_{IIa} + m_{IIi} - m_{IVa} - m_f$

Die entsprechenden Konzentrationen c ergeben sich durch Division der Mengen durch die Volumina, in denen sie gelöst sind. Das lösende Volumen V_a der Außenflüssigkeit ist in allen vier Ansätzen gleich groß und identisch mit dem pipettierten Volumen D. Das lösende Volumen V_i des Schlauchinhaltes stimmt nur in den Ansätzen I und II mit dem pipettierten Volumen S überein und ist gleich groß V_a. In den Ansätzen III und IV stimmt das lösende Wasservolumen V_{LW} nicht mit dem pipettierten Volumen S überein, sondern das pipettierte Volumen S ist vermindert um das Volumen des Hämoglobinanteiles (Berechnung des partiellen Hämoglobinsvolumens s.u.).

Damit entsprechen den auf der rechten Seite der Gleichung 4 angegebenen Mengen folgende Konzentrationen:

$$5)\quad a:\quad c_{IIa} = \frac{m_{IIa}}{V_a} \qquad b:\quad c_{IIi} = \frac{m_{IIi}}{V_i}$$

$$c:\quad c_{IVa} = \frac{m_{IVa}}{V_a} \qquad d:\quad c_f = \frac{m_f}{V_{LW}}$$

Nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes in den Ansätzen II und IV gleichen einander auch die entsprechenden Konzentrationen

$$6a)\quad c_{IIa} = c_{IIi} \qquad \text{und} \qquad 6b)\quad c_f = c_{IVa}.$$

Damit läßt sich die Gleichung 4) folgendermaßen schreiben:

$$7)\quad m_g = 2 \cdot c_{IIa} \cdot V_a - c_{IVa} \cdot V_a - c_{IVa} \cdot V_{LW}$$

Wird die gebundene Substanzmenge als Bruchteil der Gesamtmenge im Schlauch des Ansatzes IV ausgedrückt, so erhält man für die Bindung:

$$B = \frac{m_g}{m_f + m_g}$$

Mit den Gleichungen 5d), 6b) und 7) läßt sich B so ausdrücken:

$$B = 1 - \frac{c_{IVa} \cdot V_{LW}}{V_a \cdot (2 \cdot c_{IIa} - c_{IVa})}$$

Die Konzentrationen ergaben sich aus den Extinktionen, wobei von E_1 die Extinktion des Blindwertes E_o und von E_2 die Extinktion des Blindwertes E_o' abgezogen werden mußte. Da die Extinktionsmessungen in einem Bereich vorgenommen wurden, in dem das Lambert-Beer'sche Gesetz erfüllt ist, war es möglich, mit den relativen Werten der Extinktionen zu rechnen.

Bei Multiplikation von B mit dem Faktor 100 und unter Berücksichtigung, daß $V_a = D = 10$ ml, ergibt sich der gebundene Anteil ß in Prozent:

$$ß = 100 - \frac{V_{LW} (E_1 - E_o)}{20 (E_2 - E_o') - 10 (E_1 - E_o)} \quad 100\ \%$$

Das lösende Wasservolumen V_{LW} betrug bei der von uns verwendeten Humanhämoglobinlösung, die einen Hämoglobingehalt von 25 $\pm$ 1 g pro 100 ml Lösung hatte, 8,05 bis 8,20 ml.

4. Berechnung des partiellen Hämoglobinvolumens bzw. des lösenden Wasservolumens einer Hämoglobinlösung (NETTER, 1959)

Gibt man 1 g eines trockenen Proteins zu einer Lösung, so erfährt diese eine Volumenzunahme von $\bar{v}$. $\bar{v}$ ist das partielle spezifische Volumen eines Proteins und hat die Dimension ml/g. Es beträgt für Humanhämoglobin 0,749 ml/g. Multipliziert man diese Größe mit der Hämoglobinmenge in g, die in einem bestimmten Volumen enthalten ist, so erhält m an das partielle Hämoglobinvolumen, d.h. das Volumen, das von den wasserfreien Protein-Molekülen einer Hämoglobinlösung eingenommen wird. Nach Subtraktion des partiellen Hämoglobinvolumens von dem Gesamtvolumen der Lösung errechnet sich das lösende Wasservolumen dieser Hämoglobinlösung.

5. Berechnung des an die Dialysiermembran adsorbierten Anteiles

Der adsorbierte Anteil wurde als prozentualer Anteil a der adsorbierten Menge an der Gesamtmenge M im Dialysiersystem ohne Adsorption berechnet. Die adsorbierte Menge ist die Differenz zwischen M und der Gesamtmenge im Dialysiersystem nach Adsorption. Diese setzt sich aus der Menge im Schlauch (m_i) und der Menge in der Außenflüssigkeit zusammen (m_a). Demnach ist:

$$a = \frac{M - (m_i + m_a)}{M} 100$$

oder unter Verwendung der entsprechenden Konzentrationen:

$$a = 100 - \frac{c_i + c_a}{c_M} 100$$

Da nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Konzentration direkt proportional der Extinktion ist (s. auch 3.), können die entsprechenden Extinktionen eingesetzt werden (aus Ansatz I und II).

$$a = 100 - \frac{(E_{2a} - E_o') + (E_{2i} - E_o')}{(E_M - E_L)} 100$$

E_M ist die Extinktion der 10^{-4} molaren Ausgangslösung,
E_L ist die Extinktion des 1/8 molaren Phosphatpuffers von pH 7,4, in dem die Substanz gelöst wurde.

C. Substanzen und Bestimmungsmethoden

Zur Bestimmung der Bindung an Hämoglobin wurden die Substanzen der Außenflüssigkeit des Dialysiersystems in isomolaren Konzentrationen (10^{-4} molar) zugegeben. Als Außenflüssigkeit diente 1/8 molarer Phosphatpuffer vom pH 7,4. Die Substanzen, deren Bindung an Humanhämoglobin bestimmt wurde, sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die Bestimmung der Substanzkonzentration in der Außenflüssigkeit nach Einstellung des Dialysegleichgewichtes erfolgte photometrisch. Die Messung der Extinktion konnte in den meisten Fällen erst nach Abtrennung störender Beimengungen erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die Substanz aus einer Probe der Außenflüssigkeit nach Ansäuern bzw. Alkalisieren in ein Lipoidlösungsmittel (Heptan, Petroläther, Chloroform, 1,2-Dichloräthan) extrahiert und anschließend in Lauge bzw. Säure reextrahiert. Bei THIAZINAMIUM und SULFADIMETHOXIN wurden die Bestimmung störende Proteinbeimengungen in der Probe durch Fällen mit 20 %iger Trichloressigsäure und anschließendes Zentrifugieren entfernt.

Substanz	Konzentr. /ug/ml (10^{-4} m)	Mol. Gew.
S ä u r e n		
1. BARBITAL-Na	20,6	206
2. DIPHENYLHYDANTOIN-Na	27,4	274
3. HEXOBARBITAL-Na	25,8	258
4. METHOHEXITAL-Na	28,4	284
5. NITROFURANTOIN	23,8	238
6. 5-NITROSALICYLSÄURE	18,3	183
7. OXIPHENBUTAZON	34,2	342
8. PENTOBARBITAL-Na	24,8	248
9. PHENOBARBITAL-Na	25,4	254
10. PHENYLBUTAZON	30,8	308
11. SALICYLSÄURE-Na	16,0	160
12. SULFADIMETHOXIN	31,0	310
13. SULFINPYRAZON	40,4	404
14. THIAMYLAL-Na	29,2	292
15. THIOBUTABARBITAL-Na	25,0	250
16. THIOPENTAL-Na	26,4	264
B a s e n		
1. AMINOPHENAZON	23,1	231
2. ANILIN-HCl	12,9	129
3. CHLORDIAZEPOXID-HCl	33,6	336
4. CHLORIMIPRAMIN-HCl	35,1	351
5. CHLORPROMAZIN-HCl	35,5	355
6. DESIPRAMIN-HCl	30,2	302
7. IMIPRAMIN-HCl	31,6	316
8. PROMAZIN-Phosphat	38,2	382
9. PROMETHAZIN-HCl	32,0	320
10. THIAZINAMIUM-Methylsulfat	41,0	410
11. TOLONIUMCHLORID	30,5	305

Tab. 2: Zusammenstellung der Substanzen, deren Bindung an Humanhämoglobin bestimmt wurde. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um die Konzentration in der Außenflüssigkeit des Dialysiersystems bei Beginn der Dialyse und um das Molekulargewicht.

Folgende Nachweismethoden wurden im einzelnen angewandt:

THIAMYLAL, THIOBUTABARBITAL, THIOPENTAL und METHOHEXITAL wurden nach der Methode von BRODIE et al. (1950) bestimmt.

BARBITAL, HEXOBARBITAL, PENTOBARBITAL und PHENOBARBITAL wurden nach der Methode von GOLDBAUM (1948) bestimmt.

OXIPHENBUTAZON, PHENYLBUTAZON und SULFINPYRAZIN wurden nach der Methode von BURNS et al. (1953) bestimmt.

SALICYLSÄURE und NITROSALICYLSÄURE wurden nach Ansäuern mit 2 Tropfen konzentrierter HCl in 20 ml Chloroform extrahiert, anschließend in 0,1 n bzw. 1 n NaOH reextrahiert und ihre Extinktion bei 300 m/u bzw. 410 m/u gemessen.

DIPHENYLHYDANTOIN wurde nach Ansäuern mit 1,5 m KH_2PO_4-Lösung in Chloroform extrahiert, anschließend in 1 n NaOH reextrahiert und seine Extinktion bei 235 m/u gemessen.

SULFADIMETHOXIN und ANILIN wurden nach der Methode von BRATTON u. MARSHALL (1939) bestimmt.

PROMAZIN, CHLORPROMAZIN und PROMETHAZIN wurden nach der Methode von SALZMANN u. BRODIE (1956) bestimmt.

THIAZINAMIUM wurde nach der Methode von THIEME (1956) bestimmt.

TOLONIUMCHLORID (Toluidinblau O) zeigt nach Ansäuern mit 0,1 n HCl ein Extinktionsmaximum im sichtbaren Bereich des Lichtes und wurde bei 595 m/u gemessen.

CHLORDIAZEPOXID wurde mit der Farbreaktion von BRATTON u. MARSHALL (1939), modifiziert durch BEYER u. SADEE (1969), bestimmt.

AMINOPHENAZON wurde nach der Methode von BRODIE u. AXELROD (1950) bestimmt.

IMIPRAMIN, DESIPRAMIN und CHLORIMIPRAMIN wurden nach Alkalisieren mit 1 n NaOH in Petroläther extrahiert und anschließend in 0,1 n HCl reextrahiert und bei 250 m/u bestimmt.

NITROFURANTOIN wurde nach Zugabe von 0,05 m Natriumtetraborat bei 388 m/u direkt bestimmt.

III. ERGEBNISSE

Die erhaltenen Werte der Bindung von 27 Substanzen (16 Säuren und 11 Basen) an Humanhämoglobin sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß das Ausmaß der Bindung an Humanhämoglobin sowohl von sauren als auch von basischen Substanzen sehr verschieden ist.

Bei den untersuchten Säuren ergaben sich Werte zwischen 31,3 % (BARBITAL) und 86,4 % (THIAMYLAL). Auch innerhalb bestimmter Substanzgruppen sind die Bindungswerte sehr uneinheitlich. So nimmt die Bindung bei den Barbitursäure- und Thiobarbitursäure-Derivaten in der Reihenfolge BARBITAL- HEXOBARBITAL - METHOHEXITAL - PENTOBARBITAL - THIOBUTABARBITAL - THIOPENTAL - THIAMYLAL zu. Die Derivate der Phenylbutazon-Gruppe werden alle in hohem Maße gebunden (75,5 % - 83,8 %), und zwar in der ansteigenden Reihenfolge SULFINPYRAZON - PHENYLBUTAZON - OXIPHENBUTAZON. 5-NITROSALICYLSÄURE wird etwa 1,5 mal so hoch gebunden wie SALICYLSÄURE. DIPHENYLHYDANTOIN gehört mit 79,4 % Bindung zu den hoch gebundenen Substanzen, SULFADIMETHOXIN und NITROFURANTOIN liegen mit ihrem gebundenen Anteil von 60,3 % bzw. 41,0 % im mittleren bis unteren Bereich der ermittelten Werte.

Die Bindungswerte der untersuchten Basen reichen von 13,7 % (AMINOPHENAZON) bis 96,7 % (CHLORIMIPRAMIN),

Tabelle 3

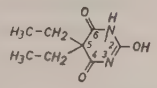
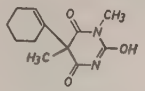
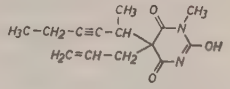
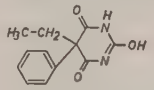
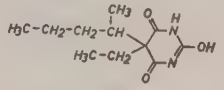
Strukturformel	Substanz	Anzahl der Messungen	Gebundener Anteil in % Hämoglobin	Gebundener Anteil in % Plasma	% ionisiert	pK_a	
	BARBITAL	11	31,3 ± 0,7	0 f	28,5	7,8	S
	HEXOBARBITAL	11	40,2 ± 0,7	54,8 a	13,7	8,2	B
	METHOHEXITAL	11	53,6 ± 0,9	83,9 a	11,2	8,3	B
	PHENOBARBITAL	11	56,6 ± 0,7	50,7 b	61,3	7,2	W
	PENTOBARBITAL	11	61,3 ± 0,6	63,2 a	20,1	8,0	B

Tabelle 3 (Fortsetzung)

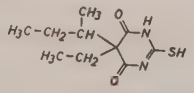
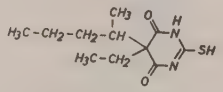
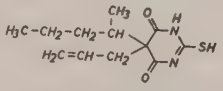
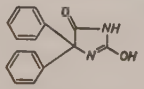
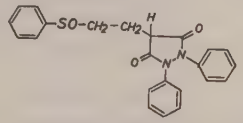
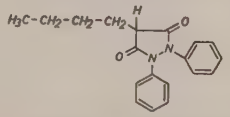
	THIOBUTABARBITAL	8	72,3 ± 0,3	71,8 a	50,0	7,4 K
	THIOPENTAL	13	78,2 ± 0,6	87,2 a	47,1	7,45 B
	THIAMYLAL	11	86,4 ± 0,2	---	53,4	7,34 B
	DIPHENYLHYDANTOIN	11	79,4 ± 0,9	85,8 b	1,6	9,2 DI
	SULFINPYRAZON	11	75,5 ± 0,4	93,0 a	99,99	2,8 D
	PHENYLBUTAZON	11	78,2 ± 0,8	98,8 a	99,87	4,5 D

Tabelle 3 (Fortsetzung)

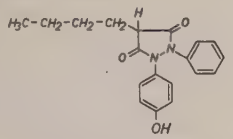
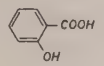
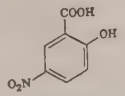
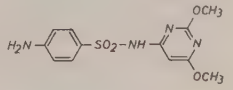
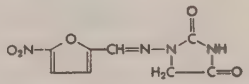
	OXIPHENBUTAZON	11	83,8 ± 0,3	92,7 b	99,80	4,7 D
	SALICYLSÄURE	11	50,4 ± 1,8	96,4 b	99,99	3,0 S
	5-NITROSALICYLSÄURE	11	76,2 ± 0,2	98,4 a	99,99	2,3 S
	SULFADIMETHOXIN	10	60,3 ± 0,5	99,1 a	92,29	6,32 R
	NITROFURANTOIN	35	41,0 ± 1,8	77,1 a	61,32	7,2 PA
	ANILIN	11	53,0 ± 0,5	37,3 a	0,16	4,6 S

Tabelle 3 (Fortsetzung)

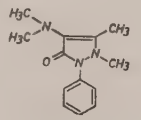
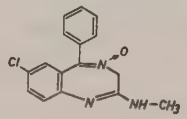
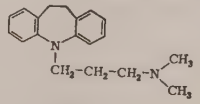
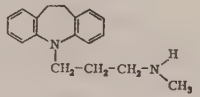
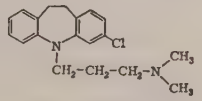
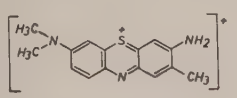
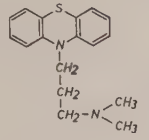
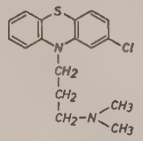
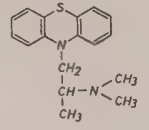
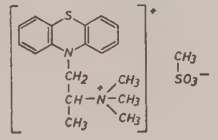
	AMINOPHENAZON	13	13,7 ± 1,8	15,0 g	0,39	5,0 S
	CHLORDIAZEPOXID	14	75,5 ± 1,4	97,8 e	0,079	4,3 F
	IMIPRAMIN	11	86,5 ± 0,1	95,8 d	99,21	9,5 G
	DESIPRAMIN	9	86,3 ± 0,9	87,9 d	99,84	10,2 G
	CHLORIMIPRAMIN	10	95,3 ± 0,3	91,6 c	78,35	7,96 F

Tabelle 3 (Fortsetzung)

	TOLONIUMCHLORID	11	83,9 ± 0,2	60,1 c	55,73	7,5 P
	PROMAZIN	11	92,8 ± 0,1	---	99,23	9,52 M
	CHLORPROMAZIN	11	96,7 ± 0,1	96,9 a	98,76	9,3 M
	PROMETHAZIN	11	90,7 ± 0,2	82,7 b	97,60	9,01 M
	THIAZINAMIUM	10	80,9 ± 1,0	---	99,98	11,23 M

Zu Tabelle 3:

Zusammenstellung der ermittelten Bindungswerte mit dem mittleren Fehler des Mittelwertes. Die Werte geben den gebundenen Anteil in Prozenten der Gesamtkonzentration an. Daneben sind der ionisierte Anteil bei pH 7,4 für die verschiedenen Substanzen und ihre pK_a-Werte aufgeführt. Die Buchstaben hinter den pK_a-Werten beziehen sich auf die zitierte Literatur und bedeuten im einzelnen: B: BUSH et al. (1966), D: DAYTON et al (1959), DI: DILL et al. (1956), F: Angabe der Herstellerfirma, G: GREEN (1967), K: KURZ (unveröffentlicht), M: MARSHALL (1955), P: PERRIN (1965), PA: PAUL et al. (1959), R: RIEDER (1963), S: SCHANKER et al. (1957), W: WADDEL u. BUTLER (1957).

Die Berechnung des ionisierten Anteiles erfolgte nach ALBERT (1960). Außerdem sind zum Vergleich die Werte der Plasmaproteinbindung aufgeführt, die der Literatur entnommen sind.

Die kleinen Buchstaben bedeuten: a: KURZ u. FRIEMEL (1967), b: GANSHORN u. KURZ (1968), c: KURZ u. VOGELSANG (noch nicht veröffentlicht), d: BORGÅ et al. (1969), e: KURZ u. STICKEL (noch nicht veröffentlicht), f: BRODIE u. HOGBEN (1957), g: BRODIE u. AXELROD (1959).

liegen aber zum größten Teil oberhalb 80 %. In der Gruppe der Benzazepine ist die Bindung des IMIPRAMINS ebenso hoch wie die des DESIPRAMINS. Deutlich höher gebunden ist dagegen das CHLORIMIPRAMIN (+ 9 %). Bei den Phenothiazinen, denen wegen der prinzipiellen Strukturgleichheit des trizyklischen Kernes das TOLONIUMCHLORID zugeordnet werden soll, ergibt sich in dem Ausmaß der Bindung folgende ansteigende Reihenfolge: THIAZINAMIUM (80,9 %) - TOLONIUMCHLORID - PROMAZIN - PROMETHAZIN - CHLORPROMAZIN (96,7 %). Die schwachen Basen ANILIN und CHLORDIAZEPOXID werden zur Hälfte bzw. zu Dreivierteln an Humanhämoglobin gebunden.

IV. DISKUSSION

A. Methodik

Zur Untersuchung der Bindung niedermolekularer Substanzen an Eiweißkörper werden in der Hauptsache vier Methoden angewandt: Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation, Ultrafiltration und Gelfiltration (KRIEGLSTEIN, 1969).

KRIEGLSTEIN (1970a) stellte eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse - erhalten durch Anwendung der Gelfiltrationsmethode - mit den anderen Methoden fest. KURZ u. TRUNK (1967) verglichen Ultrazentrifugation, Ultrafiltration und Dialyse und konnten zeigen, daß die Dialyse den geringsten Fehler aufweist. Das Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Anteil wird bei Verwendung der Dialyse-Methode am wenigsten gestört (KURZ, 1970b). Von GARN u. KIMBEL (1961) werden für die Dialyse-Methode folgende Einschränkungen angegeben, die zu einer Minderung des Aussagewertes der Ergebnisse führen können:

1. Adsorption der Substanz an die Dialysiermembran

2. DONNAN-Effekt
3. Änderung der Eiweißkonzentration
4. Änderung der Substanzkonzentration
5. Blockade der Membranpassage durch Proteinmoleküle

Diese Fehlermöglichkeiten wurden bei unseren Versuchen weitgehend ausgeschaltet.

1. Die Adsorption an die Dialysiermembran wurde für eine größere Zahl der untersuchten Substanzen nachgeprüft (Tabelle 4). Ihr Ausmaß liegt zwischen 0 % (BARBITAL, HEXOBARBITAL) und 53,7 %(TOLONIUMCHLORID). Außerdem ist sie bei ein und derselben Substanz von Ansatz zu Ansatz verschieden. Die Adsorption der Substanz an die Dialysiermembran führt jedoch zu keiner Störung der Bindung, da sie durch einen entsprechenden Kontrollansatz korrigiert wird.

Tab. 4: Ausmaß der Adsorption an die Dialysiermembran in % bei 10^{-4} molarer Konzentration.

BARBITAL	0
HEXOBARBITAL	0
METHOHEXITAL	4,0
PENTOBARBITAL	1,0
THIOBUTABARBITAL	2,7
THIOPENTAL	0,1 - 2,6
THIAMYLAL	2,1
SULFINPYRAZON	11,4
PHENYLBUTAZON	1,3
OXIPHENBUTAZON	9,6
SULFADIMETHOXIN	1,7 - 8,2
NITROFURANTOIN	5,6 - 10,1
CHLORDIAZEPOXID	0,6 - 4,2
CHLORIMIPRAMIN	5,8
TOLONIUMCHLORID	53,7
PROMAZIN	6,9
DESIPRAMIN	0,8 - 13,3

2. Der DONNAN-Effekt hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Verteilung der Substanz im Dialysiersystem, da die Dialyse bei einem pH in der Nähe des Isoelektrischen Punktes des Hämoglobins (IEP von Hb_{ox} 6,66, von Hb_{red} 6,8 nach NETTER, 1959) durchgeführt wurde (GARN u. KIMBEL, 1961).

3. Einer Änderung der Hämoglobinkonzentration während der Dialyse wurde durch straffes Knoten der Schläuche unter Vermeidung jeglicher Luftblase im Schlauch entgegengewirkt. Trotzdem ließ es sich nicht vermeiden, daß infolge der hohen osmotischen Wasseranziehung der 25 %-igen Hämoglobinlösung oder zu hohen Druckes im Schlauch bedingt durch das Knoten eine Volumenzu- bzw. -abnahme im Schlauch von +0,1 ml bis -0,1 ml eintrat. Dies wurde durch Wiegen vor und nach der Dialyse festgestellt. Der sich daraus ergebende Fehler ist jedoch kleiner als die Fehler, welche bei der Bestimmung des Hämoglobins und der Untersuchungssubstanz auftraten. In keinem der kontrollierten Fälle konnte ein merklicher Einfluß der geringfügigen Volumenänderung im Schlauch auf die Konzentration der Untersuchungssubstanz in der Außenflüssigkeit festgestellt werden.

4. Die Konzentration der Substanz in der Hämoglobinlösung ändert sich während der Dialyse, bis das Dialysegleichgewicht erreicht ist, da fortwährend Substanz in den Dialysierschlauch diffundiert und dort von den Hämoglobinmolekülen gebunden wird. Nach Erreichen des Dialysegleichgewichtes besteht ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen dem gebundenen Anteil, dem freien Anteil und dem in der Außenflüssigkeit gelösten Anteil. Eine ausreichend lange durchgeführte Dialyse sorgte dafür, daß dieses Gleichgewicht erreicht wurde (Abb. 1). Da das Ausmaß der Bindung von der Gesamtkonzentration

abhängt, gilt der ermittelte Wert der Bindung nur für die am Ende der Dialyse vorhandene Konzentration im Schlauch.

5. Eine Blockade der Membranpassage konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß sich auch nach Zugabe der Substanz zur Hämoglobinlösung im Schlauch dasselbe Gleichgewicht einstellte wie nach Zugabe zur Außenflüssigkeit.

Stoffwechselvorgänge, die zu einer Verschiebung des pH-Wertes der Hämoglobinlösung führen könnten, chemische Veränderungen der Substanzen und mikrobielle Besiedelung wurden dadurch verhindert, daß die Dialyse im Kühlraum bei + 4 °C erfolgte. Der pH-Wert wurde vor und nach der Dialyse kontrolliert und zeigte keine Änderung. Ein weiterer Fehler ergibt sich aus der Tatsache, daß zur Bestimmung der Bindung kein reines Hämoglobin verwendet wurde, sondern ein durch Ultraschall gewonnenes Hämolysat. In diesem Hämolysat befinden sich noch Stromata- und Membrananteile der Erythrozyten, die ebenfalls einen Teil der Substanz binden können. Ihr Bindungsvermögen ist jedoch gering und liegt nach Versuchen von SCHANKER et al. (1961) bei weniger als 3 %. Ihr Anteil an der Lösung ist außerdem sehr gering, denn über 90 % der Erythrozytentrokkensubstanz bestehen aus Hämoglobin (FRICK, 1961). Wir haben deshalb den Einfluß dieser Bestandteile auf die Bindung vernachlässigt.

B. Einfluß der Hämoglobinkonzentration auf die Bindung

Die Bindung der untersuchten Substanzen sollte möglichst bei einer Konzentration des Hämoglobins erfolgen, wie sie normalerweise im Erythrozyten vorkommt. HAUROWITZ (1963) gibt für Säugetiererythrozyten einen Hämoglobingehalt von 30 - 34 % an. Die Verarbeitung derart hochkonzentrierter Hämoglobinlösungen bringt Schwierigkeiten und größere Fehlermöglichkeiten mit sich. Die hohe Viskosität er-

schwert das exakte Pipettieren und Füllen der Schläuche. Außerdem verzögert sie erheblich die gleichmäßige Verteilung der Substanz in der Hämoglobinlösung und verlängert damit die Einstellung des Gleichgewichtes bei der Dialyse. Die beträchtliche osmotische Wasseranziehung führt zu der vorher genannten Volumenzunahme im Schlauch, wenn sie nicht durch ausreichenden Druck beim Knoten kompensiert wird. Deshalb wurden zunächst Versuche durchgeführt, die Auskunft über die Abhängigkeit der Bindung von der Hämoglobinkonzentration geben sollten. Als Untersuchungssubstanz diente dabei SULFADIMETHOXIN. Das Ergebnis ist in Abbildung 2 dargestellt. Oberhalb einer Konzentration von 20 gHb/100 ml geht die Kurve in einen flachen Verlauf über, d.h. in diesem Bereich ändert sich die Bindung nur noch geringfügig. Für die weiteren Versuche wurde daher eine einheitliche Hämoglobinkonzentration von 25 g/100 ml gewählt.

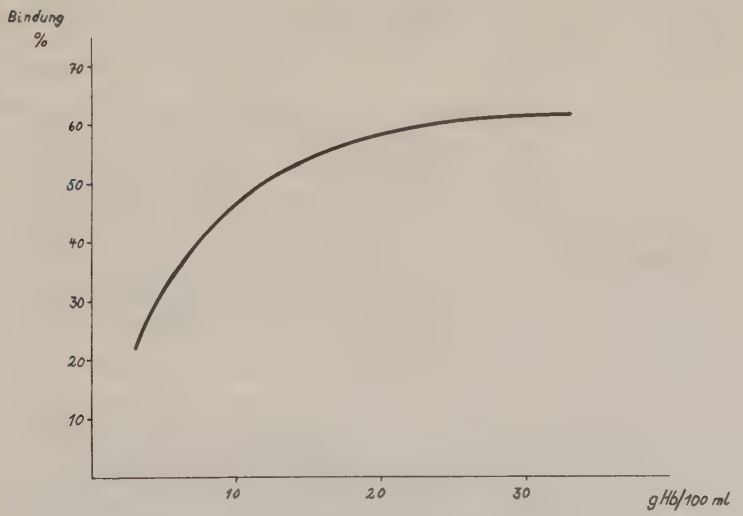


Abb. 2: Abhängigkeit der Bindung von SULFADIMETHOXIN (Ausgangskonzentration in der Außenflüssigkeit 10^{-4} molar) von der Hämoglobinkonzentration

C. Ergebnisse

1. Vergleich der Bindung an Hämoglobin mit der Bindung an Plasmaproteine (s. Tabelle 3)

Um die erhaltenen Werte für die Bindung an Humanhämoglobin mit denen der Bindung an die Plasmaproteine vergleichen zu können, sind folgende Voraussetzungen nötig: Die Messungen müssen bei annähernd gleichen Substanzkonzentrationen und möglichst mit der gleichen Methode durchgeführt worden sein. Zumindest sollte die erste Bedingung eingehalten werden. Diese Forderungen erfüllen KURZ u. FRIEMEL (1967), GANSHORN u. KURZ (1968), KURZ u. VOGELSANG (noch nicht veröffentlicht) und KURZ u. STICKEL (noch nicht veröffentlicht). BRODIE u. AXELROD (1950) benutzten zur Bestimmung der Plasmabindung von AMINOPHENAZON ebenfalls die Dialysiermethode. Die nach BORGÅ et al. (1969) zitierten Werte für IMIPRAMIN und DESIPRAMIN wurden durch Anwendung der Ultrafiltrationsmethode gewonnen. Für THIAMYLAL, PROMAZIN und THIAZINAMIUM ließen sich keine vergleichbaren Werte in der Literatur finden.

Von den Barbituraten und Thiobarbituraten werden nur BARBITAL (-31 %) und PHENOBARBITAL (-6 %) weniger an Plasmaproteine gebunden als an Hämoglobin. PENTOBARBITAL und THIOBUTABARBITAL werden in annähernd gleich großem Ausmaß an Hämoglobin bzw. Plasmaproteine gebunden ; höher an Plasmaproteine gebunden werden dagegen THIOPENTAL (+9 %), HEXOBARBITAL (+14 %), METHOHEXITAL (+30 %) und alle übrigen untersuchten sauren Substanzen.

Von den untersuchten basischen Substanzen werden PROMETHAZIN (-8 %) und ANILIN (-16 %) weniger an Plasmaproteine gebunden als an Hämoglobin. Unwesentlich ist die Differenz bei AMINOPHENAZON, DESIPRAMIN, CHLORIMIPRAMIN und CHLORPROMAZIN. Höher an Plasmaproteine werden IMIPRAMIN

(+ 10 %), CHLORDIAZEPOXID (+22 %) und TOLONIUMCHLORID (+23 %) gebunden.

Vergleicht man die Bindung der Substanzen an Plasmaproteine und Hämoglobin mit ihrem Ionisationsgrad (Tabelle 3), so läßt sich keine Gesetzmäßigkeit feststellen. Die Erklärung für dieses so verschiedene Verhalten der Bindungswerte könnte in Struktureigentümlichkeiten der bindenden Proteine liegen, von denen lediglich das Hämoglobinmolekül in seinem strukturellen Aufbau bekannt ist.

Die pharmakokinetische Bedeutung der Bindung an Hämoglobin darf nicht allein nach dem Ausmaß der Bindung beurteilt werden. Voraussetzung für eine Bindung ist, daß das Pharmakon in die Erythrozyten eindringen kann. Neben seinen Eigenschaften, an Hämoglobin gebunden zu werden, muß daß Pharmakon Eigenschaften besitzen, die es ihm erlauben, die Erythrozytenmembran zu passieren. SCHANKER (1962) beschreibt die Erythrozytenmembran als Lipoproteid-Membran, die von positiv geladenen Poren verschiedenen Durchmessers durchbrochen ist. Diese Membran läßt bevorzugt Anionen - gleichgültig, ob hoher oder niedriger Lipoidlöslichkeit - hindurchtreten. Für Kationen (Basen) ist diese Membran dagegen nur nach Maßgabe ihrer Lipoidlöslichkeit durchlässig. Die Lipoidlöslichkeit einer Substanz kann durch ihren Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten (VK) ausgedrückt werden. Substanzen mit hohem VK dringen schnell in den Erythrozyten ein, unabhängig davon, ob es sich um eine Säure oder Base handelt. Jedoch werden basische Substanzen mit niedrigem VK nur langsam oder überhaupt nicht die Erythrozytenmembran durchdringen können, da ihnen der Weg durch die positiv geladenen Poren nicht möglich ist. Anionen mit niedriger Lipoidlöslichkeit können durch die Poren in den Erythrozyten hineingelangen, es sei denn, ihr Molekül ist größer als der Porendurchmesser.

An einem Beispiel soll die Bedeutung der Hämoglobinbindung im Vergleich zur Plasmabindung unter Berücksichtigung der Permeationsgeschwindigkeit dargestellt werden: Nach SCHANKER et al. (1964) tritt SALICYLSÄURE sehr schnell in den Erythrozyten ein. Trotz der fast um die Hälfte niedrigeren Hämoglobinbindung wird die an Hämoglobin gebundene Menge größer sein als die an Plasma gebundene, da der Hämoglobinanteil im gleichen Volumen Blut mehr als doppelt so groß ist wie der Anteil an Plasmaproteinen. Für CHLORPROMAZIN, das eine sehr große Lipoidlöslichkeit besitzt (AHTEE u. PAASONEN, 1968; GLASSER u. KRIEGLSTEIN, 1970), läßt sich die entsprechende theoretische Überlegung sehr gut aus der Literatur belegen. Seine Bindung an Hämoglobin und Plasmaproteine ist gleich groß, man würde also in den Erythrozyten eine doppelt so große Menge erwarten wie im Plasma. AHTEE u. PAASONEN (1966) haben das auch tatsächlich festgestellt.

2. Vergleich der Hämoglobinbindung mit der Lipoidlöslichkeit

Über die Natur der Eiweißbindung herrscht trotz der Vielzahl an Untersuchungen noch immer keine vollständige Klarheit. Ionen- und Wasserstoffbrückenbindung, Van-der-Waalsche-Kräfte sowie sterische Effekte könnten eine Rolle spielen in der Wechselwirkung niedermolekularer Substanzen mit Makromolekülen (BLOOM u. LAUBACH, 1962; SCHOLTAN, 1964; KRIEGLSTEIN, 1970b). In neueren Untersuchungen wird die Bedeutung des hydrophoben Charakters der Substanzen für die Proteinbindung hervorgehoben (ALI MOHAMMADZADEH et al., 1967, 1969a und 1969b; BIRD u. MARSHALL, 1967; GLASSER u. KRIEGLSTEIN, 1970; HANSCH et al., 1965; KIEHS et al., 1966; SCHOLTAN, 1964 und 1968; WISHNIA u. PINDER, 1964 und 1966). Der hydrophobe Charakter einer Substanz wird ausgedrückt durch ihren Lipid/Wasser-Verteilungskoeffizienten (VK).

Vergleiche zwischen dem Ausmaß der Proteinbindung und diesem Verteilungskoeffizienten sind nur innerhalb einer Substanzgruppe erlaubt, deren einzelne Vertreter sich nur in ihrem hydrophoben Charakter unterscheiden, in ihren anderen physiko-chemischen Eigenschaften aber nicht wesentlich verschieden sind. Zu diesem Zweck sollen einige Vertreter der Barbitursäure- und Thiobarbitursäuregruppe herangezogen werden (Tabelle 5 und 6). In Tabelle 5 werden die Bindung von BARBITAL, PHENOBARBITAL, PENTOBARBITAL und THIOPENTAL an Hämoglobin und Plasmaproteine mit ihrem VK Erdnußöl/Phosphatpuffer pH 7,4 verglichen.

Substanz	VK	% gebunden an Hämoglobin	% gebunden an Plasmaproteine
BARBITAL	0,26	31,3	0
PHENOBARBITAL	1,6	56,6	50,7
PENTOBARBITAL	5,8	61,3	63,2
THIOPENTAL	63,0	78,2	87,2

Tab. 5: Vergleich zwischen Hämoglobin- und Plasmabindung und Verteilungskoeffizienten Erdnußöl/Phosphatpuffer pH 7,4 (VK aus MARK et al., 1958). Substanzkonzentration 10^{-4} molar.

Es zeigt sich, daß mit größer werdendem VK sowohl die Bindung an Hämoglobin als auch an Plasmaproteine zunimmt. In Tabelle 6 wird die Bindung von 4 Barbituraten und 2 Thiobarbituraten an Hämoglobin bzw. Plasmaproteine verglichen mit ihrem VK n-Octanol/Phosphatpuffer pH 7,4.

Es fällt bei Tabelle 6 auf, daß auch für das System n-Octanol/Phosphatpuffer einem ansteigenden VK eine Zunahme der Bindung an Plasmaproteine bzw. Hämoglobin entspricht. Eine Ausnahme von dieser Gesetzmäßigkeit macht jedoch das METHOHEXITAL, für das man entsprechend seinem hohen VK auch eine größere Bindung an Hämoglobin erwarten würde.

Substanz	VK	% gebunden an Hämoglobin	% gebunden an Plasmaproteine
BARBITAL	3,697	31,3	0
HEXOBARBITAL	27,644	40,2	54,8
PENTOBARBITAL	111,649	61,3	63,2
THIOBUTABARBITAL	194,831	72,3	71,8
METHOHEXITAL	316,868	53,6	83,9
THIOPENTAL	606,130	78,2	87,2

Tab. 6: Vergleich zwischen Hämoglobin- und Plasmabindung und Verteilungskoeffizienten n-Octanol/Phosphatpuffer pH 7,4 (VK aus APPIAH, 1971). Substanzkonzentration 10^{-4} molar.

Vergleicht man die Hämoglobinbindung dieser Substanzen mit Verteilungskoeffizienten, die an anderen Lipid/Wasser-Systemen bestimmt wurden (APPIAH, 1971), so lassen sich - ebenfalls mit der Ausnahmestellung des METHOHEXITALS - ähnliche Beziehungen für BUTANOL, ISOPENTYLACETAT und DIÄTHYLÄTHER feststellen. Dagegen zeigen die Verteilungskoeffizienten zwischen BENZOL, HEPTAN, PETROLÄTHER, CHLOROFORM, 1,2-DICHLORÄTHAN, TETRACHLORKOHLENSTOFF, OLIVENÖL, LECITHIN und Phosphatpuffer pH 7,4 überhaupt keine Beziehung zum Ausmaß der Hämoglobinbindung. Die Ausnahme-

stellung des METHOHEXITALS und die fehlende Korrelation zwischen Bindung und Verteilungskoeffizienten bei den übrigen organischen Lösungsmitteln und Lipiden könnten bedeuten, daß der hydrophobe Charakter einer Substanz nicht allein bestimmend ist für das Ausmaß der Bindung an Proteine, sondern daß neben der hydrophoben Wechselwirkung auch die anderen Kräfte mehr oder minder stark in Erscheinung treten (AHTEE et al., 1967). Es wäre weiterhin möglich, daß die Art von Lipoidlöslichkeit, die bei der Bindung von Bedeutung ist, wesentlich komplexerer Natur ist, als daß sie von unseren einfachen Verteilungssystemen erfaßt werden kann.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Bindung von 16 sauren und 11 basischen organischen Substanzen an Humanhämoglobin wurde mittels Gleichgewichtsdialyse bestimmt. Die bestimmten Werte werden mit aus der Literatur ermittelten Werten für die Bindung an Plasmaproteine verglichen. Dabei zeigt sich, daß von den untersuchten Substanzen einige mehr und einige weniger an Hämoglobin gebunden werden als an Plasmaproteine.

Die Bedeutung der Hämoglobinbindung liegt in der im lebenden Organismus vorhandenen Menge des Trägerproteins.

Eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Hämoglobinbindung vom Dissoziationsgrad der untersuchten Substanzen konnte nicht gefunden werden.

Für einige Derivate der Barbitur- und Thiobarbitursäure konnte eine Beziehung zwischen hydrophobem Charakter und Ausmaß ihrer Hämoglobinbindung festgestellt werden.

Der an einfachen Lipid/Wasser-Verteilungssystemen ermittelte Charakter der Lipoidlöslichkeit reicht jedoch nicht aus, um die Art der Lipoidlöslichkeit, die für die Proteinbindung von Bedeutung ist, umfassend zu beschreiben.

LITERATURVERZEICHNIS

AHTEE, L. und PAASONEN, M.K. (1966): Distribution of some phenothiazines in red blood cells and platelets. J. Pharmacol. 18: 126 - 128

AHTEE, L., MATTILA, M.J. und VAPAATALO, H.J. (1967): The binding of some phenothiazines to human serum in vitro Biochem. Pharmacol. 16: 2432 - 2435

AHTEE, L. und PAASONEN, M.K. (1968): Potentiation of 5-hydroxytryptamine release from platelets by desmethylation of chlorpromazine and related agents Acta Pharmacol. et Toxicol. 26: 213 - 221

ALBERT, A. (1960): Selective Toxicity S. 209 und 210 Methuen und Co. Ltd., London

ALI MOHAMMADZADEH-K., FEENEY, R.E., SAMUELS, R.B. und SMITH, L.M. (1967): Solubility of alkanes in protein solutions Biochim. Biophys. Acta 147: 583 - 589

ALI MOHAMMADZADEH-K., FEENEY, R.E. und SMITH, L.M. (1969a): Hydrophobic binding of hydrocarbons by proteins I. Relationship of hydrocarbon structure Biochim. Biophys. Acta 194: 246 - 255

ALI MOHAMMADZADEH-K., SMITH, L.M. und FEENEY, R.E. (1969b): Hydrophobic binding of hydrocarbons by proteins II. Relationship of protein structure Biochim. Biophys. Acta 194: 256 - 264

ALY, F.W., BRAUN, H.J., HADAM, W.R. und KALLEE, E. (1968): Zur Bedeutung der Eiweißvehikelfunktion Arzneimittel-Forsch. 18: 1467 - 1482

APPIAH, A. (1971): Dissertation, Universität München

BENNHOLD, H., KYLIN, E. und RUSZNYAK, S. (1938): Die Eiweißkörper des Blutplasmas S. 220 - 303 Verlag Th. Steinkopff, Dresden und Leipzig

BEYER, K.-H. und SADEE, W. (1969): Spektrophotometrische Bestimmung von 5-Phenyl-1,4-benzodiazepin-Derivaten und Untersuchungen über den Metabolismus des Nitrazepams Arzneimittel-Forsch. 19: 1929 - 1931

BIRD, A.E. und MARSHALL, A.C. (1967): Correlation of serum binding of penicillins with partition coefficients Biochem. Pharmacol. 16: 2275 - 2289

BLOOM, B.M. und LAUBACH, G.D. (1962): The relationship between chemical structure and pharmacological activity
Ann. Rev. Pharmacol. 2: 67 - 108

BORGA, O., AZARNOFF, D.L., FORSHELL, G.P. und SJÖQVIST, F. (1969): Plasma protein binding of tricyclic antidepressants in man
Biochem. Pharmacol. 18: 2135 - 2143

BRATTON, A.C. und MARSHALL, E.K. Jr. (1939): A new coupling component for sulfanilamid determination
J. Biol. Chem. 128: 537 - 550

BRODIE, B.B. und AXELROD, J. (1950): The fate of aminopyrine (Pyramidon) in man and methods for the estimation of aminopyrine and its metabolites in biological material
J. Pharmacol. 99: 171 - 184

BRODIE, B.B., MARK, L.C., PAPPER, E.M., LIEF, P.A., BERNSTEIN, E. und ROVENSTINE, E.A. (1950): The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. 98: 85 - 96

BRODIE, B.B. und HOGBEN, C.A.M. (1957): Some physico-chemical factors in drug action
J. Pharm. Pharmacol. 9: 345 - 380

BURNS, J.J., ROSE, R.K., CHENKIN, T., GOLDMAN, A., SCHULERT, A. und BRODIE, B.B. (1953): The physiological disposition of phenylbutazone in man and a method for its estimation in biological material J. Pharmacol. 109: 346 - 357

BUSH, M.T., BERRY, G. und HUME, A. (1966): Ultra-short-acting barbiturates as oral hypnotic agents in man Clin. Pharmacol. Therap. 7: 373 - 378

DAYTON, P.G., BERGER, L., YÜ, T.F., SICAM, L.E., LANDRAU, M.A., GUTMANN, A.B. und BURNS, J.J. (1959): Relationship between pKa and renal excretion of various phenylbutazone analogues Fed. Proc. 18: 382

DILL, W.A., KAZENKO, A., WOLF, M.A. und GLATZKO, A.J. (1956): Studies on 5,5-diphenylhydantoin (dilantin) in animals and man J. Pharmacol. 118: 270 - 279

Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen (1960) S. 523 und S. 548 J. R. Geigy AG, Basel

FRICK, P.G. (1961): Der Erythrozyt als Beispiel biologischer Zweckmäßigkeit Schweiz. med. Wschr. 91: 1245 - 1249

FRIEMEL, G. (1968): Die Bindung von Arzneimitteln an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten
Inaugural-Dissertation aus dem Pharmakologischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität München

GANSHORN, A. und KURZ, H. (1968): Unterschiede zwischen der Proteinbindung Neugeborener und Erwachsener und ihre Bedeutung für die pharmakologische Wirkung
Arch. Pharmak. 260: 117 - 118

GARN, F.W. und KIMBEL, K.H. (1961): Verbleib und Ausscheidung von Depotsulfonamiden
Arzneimittel-Forsch. 11: 701 - 707

GLASSER, H. und KRIEGLSTEIN, J. (1970): Die Eiweißbindung einiger Psychopharmaka mit trizyklischem Ringsystem in Abhängigkeit von ihrer chemischen Konstitution
Arch. Pharmak. 265: 321 - 334

GOLDBAUM, L.R. (1948): An ultraviolet spectrophotometric procedure for the determination of barbiturates
J. Pharmacol. 94: 68 - 75

GOLDSTEIN, A. (1949): The interaction of drugs and plasma proteins
Pharmacol. Rev. 1: 102 - 165

GREEN, A.L. (1967): Ionization constants and water solubilities of some aminoalkyl-phenothiazine tranquillizers and releated compounds.
J. Pharm. Pharmacol. 19: 10 - 16

HANSCH, C., KIEHS, K. und LAWRENCE, G.L. (1965): The role of substituents in the hydrophobic bonding of phenols by serum and mitochondrial proteins
J. Amer. chem. Soc. 87: 5770

HAUROWITZ, F. (1963): The chemistry and function of proteins
Academic Press, New York, London

KIEHS, K., HANSCH, C. und MOORE, L. (1966): The role of hydrophobic bonding in the binding of organic compounds by bovine hemoglobin
Biochem. 5: 2602 - 2605

KRIEGLSTEIN, J. (1969): Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Klin. Wschr. 47: 1125 - 1130

KRIEGLSTEIN, J. (1970 a): Bestimmung der Eiweißbindung von Pharmaka mit Hilfe der Sephadex-gelfiltration
Beilage zu einem Teil der Auflage von Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie
Band 252: Heft 4/5 S 11

KRIEGLSTEIN, J. (1970 b): Korrelation der Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten einiger trizyklischer Psychopharmaka mit deren Albuminbindung
Beilage zu einem Teil der Auflage von Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie
Band 252: Heft 4/5 S 13

KURZ, H. und WALLER, H.-D. (1955): Die Genauigkeit der optischen Bestimmung von Kohlenoxyd-Hämoglobin im Blut
Arch. Toxikol. 15: 291 - 305

KURZ, H. und FRIEMEL, G. (1967): Artspezifische Unterschiede der Bindung an Plasmaproteine
Arch. Pharmak. 257: 35 - 36

KURZ, H. und TRUNK, H. (1967): Some interfering factors in determining the protein-bound fraction of chemotherapeutics
Vortrag V. Internationaler Kongreß für Chemotherapie, Wien

KURZ, H. (1970 a): Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie
Präp. Pharmazie 6: 1 - 12

KURZ, H. (1970 b): Analytische Probleme bei der Bestimmung der Proteinbindung durch Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Dialyse
Beilage zu einem Teil der Auflage von Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie
Band 252: Heft 4/5 S 9 und S 10

KURZ, H. (unveröffentlicht)

KURZ, H. und STICKEL, H. H. (noch nicht veröffentlicht)

KURZ, H. und VOGELSANG, H. G. (noch nicht veröffentlicht)

MARK, L.C., BURNS, J. J., BRAND, L., CAMPOMANES, C.J., TROUSOF, N., PAPPER, E.M. und BRODIE, B.B. (1958): The passage of Thiobarbiturates and their oxygen analogs into brain .
J. Pharmacol. 123: 70 - 73

MARSHALL, P.B. (1955): Some chemical and physical properties associated with histamin antagonism
Brit. J. Pharmacol. 10: 270 - 278

NETTER, H. (1959): Theoretische Biochemie
S. 290 und S. 312, S. 186
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg

PAUL, M.F., BENDER, R.C. und NOHLE, E.G. (1959): Renal excretion of nitrofurantoin (Furadantin) Am. J. Physiol. 197: 580 - 384

PERRIN, D.D. (1965): Dissociation constants of organic bases in aqueous solution S 441 Butterworths, London

RIEDER, J. (1963): Physikalisch-chemische und biologische Untersuchungen an Sulfonamiden Arzneimittel-Forsch. 13: 81 - 88

SALZMANN, N. und BRODIE, B.B. (1956): Physiological disposition and fate of chlorpromazin and a method for its estimation in biological material J. Pharmacol. 118: 46 - 54

SCHANKER, L.S., PARKHURST, A.S., BRODIE, B.B. und HOGBEN, C.A. M. (1957): Absorption of drugs from the stomache, I. The rat J. Pharmacol. 120: 528 - 539

SCHANKER, L.S., NAFPLIOTIS, P.A. und JOHNSON, J.M. (1961): Passage of organic bases into human red cells J. Pharmacol. 133: 325 - 331

SCHANKER, L.S. (1962): Passage of drugs across body membranes Pharmacol. Rev. 14: 501 - 503

SCHANKER, L.S., JOHNSON, J.M. und JEFFREY, J.J. (1964): Rapid passage of organic anions into human red cells
Am. J. Physiol. 207: 503 - 508

SCHELER, W. (1969): Grundlagen der allgemeinen Pharmakologie
S. 219 - 271
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

SCHOLTAN, W. (1964): Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper
Arzneimittel-Forsch. 14: 469 - 473

SCHOLTAN, W. (1968): Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonucleinsäure
Arzneimittel-Forsch. 18: 505 - 517

SMITH, P.K., GLEASON, H.L., STOLL, C.G. und OGORZALEK, S. (1946): Studies on the pharmacology of salicylates
J. Pharmacol. 87: 237 - 255

THIEME, H. (1956): Zur Analytik einiger therapeutisch verwendeter Phenothiazinderivate. 3. Mitteilung: Beitrag zur photometrischen Bestimmung
Die Pharmazie 11: 725 - 726

WADDELL, W.J. und BUTLER, T.C. (1957): Distribution and excretion of phenobarbital
J. Clin. Invest. 36: 1217

WISHNIA, A. und PINDER, T.W. (1964): Hydrophobic interactions in proteins: Conformation changes in bovine serum albumin below pH 5 Biochem. 3: 1377 - 1384

WISHNIA, A. und PINDER, T.W. (1966): Hydrophobic interactions in proteins: The alkane binding site of ß-Lactoglobuline A and B Biochem. 5: 1534 - 1542

WITZGALL, H. und BOYENS, H. (1964): Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von Arzneistoffen Arch. Int. Pharmacodyn. 148: 511 - 535

Lebenslauf

Als Sohn des Pfarrers Gotthard Hilzenbecher und seiner Ehefrau Helene, geb. Pollok wurde ich am 22.2. 1943 in Ehrenforst/Oberschlesien geboren.

Mein Abitur legte ich 1964 am Gymnasium Waldshut ab.

1964 immatrikulierte ich mich für das Fach Medizin an der Universität Tübingen. Nach dem Vorphysikum setzte ich meine vorklinischen Studien an der Universität Kiel fort, wo ich 1966 das Physikum ablegte. Während der klinischen Semester studierte ich an der Universität München. Die ärztliche Prüfung bestand ich im Februar 1970 in München.

Ab März 1970 arbeitete ich als Medizinalassistent im Pharmakologischen Institut der Universität München. Die erforderliche klinische Ausbildung als Medizinalassistent erhielt ich am St. Marien Hospital in Wattenscheid.

Am 2. Dezember 1971 erhielt ich die Approbation. Zur Zeit arbeite ich als Assistenzarzt in der inneren Abteilung des St. Marien Hospitals in Wattenscheid.